硒对脂多糖诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤的保护作用

郭咏梅　张博綦　闫素梅*　史彬林　郭晓宇

（内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018）

摘　要：本试验旨在研究硒（Se）对脂多糖（LPS）诱导的奶牛乳腺上皮细胞（BMEC）氧化损伤的保护作用及其机制。将贴壁生长的第 3 代 BMEC 随机分为 8 组，每组 6 个重复，每个重复 1 个培养孔。对照(CON)组采用基础培养液，不添加 Se 和 LPS，培养 30 h；LPS 组和 6 个 Se 保护组在基础培养液中分别添加不同水平的 Se（0、10、20、50、100、150 和 200 nmol/L），培养 24 h 后，加入 1 μg/mL LPS 作为外源刺激作用 6 h。结果表明：1）与 CON 组相比，LPS 组 BMEC 的相对增殖率显著下降($P<0.05$)，谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）、硫氧还蛋白还原酶（TrxR）、总超氧化物歧化酶（T-SOD）、过氧化氢酶（CAT）活性和总抗氧化能力（T-AOC）均显著下降($P<0.05$)，*GPx*1 和 *TrxR*1 的基因和蛋白表达量、硒蛋白 P（SelP）含量也显著下调($P<0.05$)；而 LPS 组的一氧化氮（NO）含量，诱导型一氧化氮合酶（iNOS）活性及其基因和蛋白表达量，炎症因子肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白介素-1（IL-1）和白介素-6（IL-6）含量及其基因表达量，活性氧（ROS）活性，丙二醛（MDA）含量均显著升高($P<0.05$)，丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路相关因子 p38 丝裂原活化蛋白激酶（*p38MAPK*）、c-Jun 氨基端激酶(*JNK*)、细胞外信号调节激酶 1/2（*ERK*1/2）的基因表达量呈相似变化。2）与 LPS 组相比，Se 保护组随 Se 添加水平的增加，相对增殖率,T-SOD、CAT、GPx、TrxR 活性，T-AOC，*GPx*1、*TrxR*1 基因和蛋白表达量均呈先升高后下降趋势；而 NO 含量，iNOS 活性及其基因和蛋白表达量，炎症因子 TNF-α、IL-1、IL-6 含量及其基因表达量，MAPK 信号通路相关因子 *ERK*1/2、*JNK*、*p38MAPK* 的基因表达量，ROS 活性，MDA 含量呈先降低后升高的趋势;以 20~100 nmol/L Se 保护效果较好,综合来看 50 nmol/L Se 保护效果最好。结果提示，Se 可提高 BMEC 的抗氧化功能，对 LPS 引起的细胞氧化损伤具有保护作用，其机制是 Se 增强 TrxR 活性从而抑制 MAPK 信号通路的激活，最终减少 NO 的大量释放，但过高水平的 Se 会对细胞造成损伤。培养液中 20~100 nmol/L Se 的保护作用

收稿日期：2017-02-27
基金项目：国家自然科学基金（31560650）
作者简介：郭咏梅（1989—），女，内蒙古呼和浩特人，博士研究生，从事动物矿物质与维生素营养的研究。E-mail： ymguo2015@163.com
*通信作者：闫素梅，教授，博士生导师，E-mail： yansmimau@163.com

较好，尤其以 50 nmol/L Se 效果最好。

关键词：硒代蛋氨酸；脂多糖；奶牛乳腺上皮细胞；氧化损伤；保护作用

中图分类号：S823

奶牛乳腺上皮细胞（bovine mammary epithelial cell,BMEC）是乳成分合成与分泌的重要场所，其生物合成能力决定了奶牛乳腺的产奶潜力[1]。泌乳期的 BMEC 由于高代谢率引起的大量氧自由基蓄积，这是诱发细胞氧化损伤及抗氧化机能降低进而引起乳房炎等代谢性疾病和乳品质降低的重要原因之一[2]。微量元素硒（Se）主要通过合成硒蛋白发挥其生物学功能，对奶牛的抗氧化功能和免疫功能具有显著促进效果[3]。一些研究也指出，在饲粮 Se 推荐需要量的基础上，适当提高 Se 水平可进一步提高抗氧化功能[4]，但关于其影响机制尚不完全清楚。因此，深入研究 Se 对乳腺氧化应激损伤的缓解作用及其机理，为在生产中科学补加 Se、保证奶牛乳腺健康和改善乳品质具有重要的理论与实际意义。

一氧化氮（NO）是由诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase,iNOS）催化 *L*-精氨酸经多步氧化还原反应生成的气体信号分子。研究证实，NO 具有双向调节功能。一方面，适量的 NO 参与机体多种生理活动，并且具有抗菌及抗肿瘤作用，保护动物免受外界环境的感染[5]。另一方面，过量的 NO 还会导致活性氮的产生、细胞信号通路的阻断，诱导机体发生氧化应激及炎症反应[6]。一些研究指出，硒代蛋氨酸可下调鼠软骨细胞中可诱导 iNOS 和环氧合酶-2 产生的白介素-1β（*IL*-1*β*）基因的表达，进而抑制 NO 和前列腺素 E2 的大量产生[7]。Ferret 等[8]的研究指出，硫氧还蛋白（thioredoxin,Trx）体系可保护人单核巨噬细胞免受 NO 引起的损伤，细胞对 NO 损伤作用的易感性与硫氧还蛋白还原酶（thioredoxin reductase,*TrxR*）和 *Trx* 的基因表达量呈负相关。Obata 等[9]指出 p38 丝裂原活化蛋白激酶（p38 mitogen-activated protein kinase,p38MAPK）信号通路的激活能促进单核巨噬细胞产生肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α,TNF-α）、白介素-1（IL-1）、白介素-6（IL-6）等多种细胞因子的基因表达；引起细胞内 *iNOS* 基因的表达量增加，产生大量 NO。细胞凋亡信号激酶-1（apoptosis signal-regulating kinase-1,ASK-1）是 MAPK 信号通路的上游激动剂，还原型 Trx 转变为氧化形式时，ASK-1 被激活，从而激活 MAPK 信号通路[10]。体内和体外研究结果得出，Se 可以增加奶牛血液和 BMEC 的 TrxR 活性，改善其抗氧化功能，减缓氧化损伤[3,11]。这些研究提示，Se 对 BMEC 氧化损伤的保护作用机制可能通过增强硒蛋白 TrxR 活性调节

MAPK 信号通路来影响细胞因子 IL 的产生，进而调节 NO 的生成，但相关研究甚少，确切机理需要进一步探讨。脂多糖（lipopolysaccharide,LPS）诱发的奶牛乳腺炎模型被国际公认是研究乳房炎的主要病理模型[12]。本课题组利用 LPS 为应激源，诱导 BMEC 产生大量的 NO，已成功建立了细胞的氧化应激模型[13]。鉴此，本试验以 LPS 诱导 BMEC 氧化应激，主要从 TrxR 活性和 MAPK 信号通路与 NO 的关系的角度，研究不同水平 Se 对细胞损伤的预保护作用及其可能机理，为提高奶牛乳腺组织抗氧化功能、科学补加 Se 和保障乳腺健康提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　BMEC 的培养

BMEC 采用胶原酶消化法获得。于内蒙古自治区呼和浩特市北亚清真冷库挑选 3 头健康的奶牛，采集乳腺组织，剪去外层组织，取数块深层组织依次经含有 3×双抗的磷酸盐缓冲液（PBS）清洗 3 遍、75%酒精清洗 1 遍、含有 1×双抗的 PBS 清洗 3 遍。在深层剪取约 1 mm^3 大小的小块于 5 mL 离心管中，充分剪碎后加入等体积的 0.5%胶原酶Ⅱ，置于 CO_2 恒温培养箱（HF240,HealFORS,37 ℃和 5% CO_2）中消化 1 h。将消化液用 80 目的细胞滤网过滤，收集滤液于 15 mL 的离心管中,离心后弃上清。所得沉淀用 PBS 重新悬浮离心，弃去上清，所得沉淀用培养液重新悬浮细胞后接种于 25 cm^2 的培养瓶中，置于 CO_2 恒温培养箱中培养。待原代细胞的贴壁率达到 80%~90%时，进行细胞纯化及传代。将分离纯化后的 BMEC 经荧光免疫细胞染色法鉴定后，连续培养到第 3 代，将其分别接种于试验设计要求的细胞培养器皿中，加入完全培养液在 37 ℃、5%CO_2 条件下培养细胞，当细胞贴壁率达到 80%~90%时，弃去旧培养液，加入新的不含胎牛血清的培养液饥饿培养 24 h 之后，按照试验设计进行后续试验。

1.2 试验设计

LPS（L4391）和硒代蛋氨酸（Se 源,纯度≥98%,S3132）均购自 Sigma 公司。

以 LPS 诱导 BMEC 氧化损伤，建立氧化损伤模型，LPS 作用时间及作用浓度参照高瑞峰[12]的研究结果确定。将贴壁生长的第 3 代 BMEC 随机分为 8 组，每组 6 个重复，每个重复 1 个培养孔。对照(CON)组采用基础培养液，不添加 Se 和 LPS，培养 30 h；LPS 组利用基础培养液培养 24 h 后，加入 1 μg/mL 的 LPS 作用 6 h；不同水平 Se 保护组分别在基础培

养液中添加 10(LSe10 组)、20（LSe20 组）、50（LSe50 组）、100（LSe100 组）、150（LSe150 组）及 200 nmol/L 的 Se（LSe200 组），培养 24 h 后，加入 1 μg/mL 的 LPS 作用 6 h。基础培养液中蛋氨酸的浓度为 115 588.99 nmol/L，因此硒代蛋氨酸的补加对基础培养液蛋氨酸浓度的影响很小。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 相对增殖率

BMEC 相对增殖率采用噻唑蓝（MTT）法测定。将第 3 代 BMEC 悬液接种于 96 孔培养板中，按照试验设计培养，向各培养孔中加入 20 μL 的 MTT（5 mg/mL），培养 4 h 后，弃去上清液，甩板并拍干液体，再向每孔加入 100 μL 二甲基亚砜，使用全自动酶标仪（Synergy 4,BioTek）振荡 10 min 后，检测各孔 490 nm 吸光度值（$OD_{490\ nm}$）。

相对增殖率（%）=（试验组 $OD_{490\ nm}$/CON 组 $OD_{490\ nm}$）×100。

1.3.2 抗氧化功能及炎症因子

将第 3 代 BMEC 悬液接种于 60 mm 细胞培养皿中，按照设计要求培养 30 h 后，收集细胞培养液于 1.5 mL Eppendorf 管中 15 455×*g* 离心 10 min，收集上清液用于抗氧化功能、炎症因子含量的测定。总抗氧化能力（T-AOC）采用钼酸铵显色法测定，总超氧化物歧化酶（T-SOD）活性采用黄嘌呤氧化酶法测定，过氧化氢酶（CAT）活性采用比色法测定，iNOS 活性及硒蛋白 P(SelP)、NO、IL-1、IL-6、TNF-α 的含量均采用酶联免疫吸附测定法测定，具体操作按照试剂盒说明书进行，试剂盒购自美国 R&D 公司。

将上述弃去细胞培养液后的细胞培养皿置于冰上，加入 1 mL PBS 清洗 2 遍，加入 1 mL 动物细胞裂解液于冰上裂解 30 min，用细胞刮板刮取贴壁细胞，收集于 1.5 mL Eppendorf 离心管中，4 ℃、15 455×*g* 离心 10 min，收集上清液用于细胞内的抗氧化功能的测定。其中，谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）活性采用二硫代二硝基苯甲酸法测定，丙二醛（MDA）含量采用硫代巴比妥酸法测定，操作均按照试剂盒说明书进行，试剂盒购自南京建成生物研究所。活性氧（ROS）及 TrxR 活性均采用酶联免疫吸附测定法测定，具体操作按照试剂盒说明书进行，试剂盒购自美国 R&D 公司。细胞内的 GPx 活性、MDA 含量换算为总蛋白质基础，总蛋白质含量采用二喹啉甲酸（BCA）法测定，试剂盒购自北京碧云天公司。

1.3.3 细胞内基因的相对表达量

以 β-肌动蛋白（β-actin）作为内标基因，采用实时荧光定量 PCR 技术测定细胞中 *GPx*1、*GPx*4、*SelP*、*TrxR*1、*iNOS*、*IL*-1、*IL*-6、*TNF-α*、p38*MAPK*、c-Jun 氨基端激酶(c-Jun N terminal kinase,*JNK*）、细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinas 1/2,*ERK*1/2)的基因表达量。

1.3.4　细胞内蛋白表达量

以 β-actin 作为内参蛋白，采用 Western Blot 法测定 BMEC 内 GPx1、TrxR1 和 iNOS 的蛋白表达量，每个处理 3 个重复。主要操作步骤：将 30 μg 蛋白质样品与 5×上样缓冲液以 4:1 的体积比混合，于干煮仪变性 5 min 后，用上样针将样品加到点样孔内。蛋白质分别依次经浓缩胶（80 V、30 min）、分离胶（120 V、90 min）电泳分离，之后进行转膜（100 V、50 min）。转膜完成后，用 Tris 缓冲液（TBST）洗涤膜 3 次，每次 5 min，室温封闭 1 h，然后用 TBST 洗涤膜 1 次，每次 5 min。将膜分别在 4 ℃条件下过夜进行一抗[兔抗 β-actin 多克隆抗体（20536-1-AP,Proteintech,1:2 000 稀释）、兔抗 GPx1 多克隆抗体（ab22604,Abcam,1:1 000 稀释）、兔抗 TrxR1 多克隆抗体（ab16840,Abcam,1:500 稀释）和兔抗 iNOS 多克隆抗体（NBP1-97471,Novus Biological,1:1 000 稀释）孵育，次日进行二抗孵育，与辣根过氧化物酶（HPR）标记的山羊抗兔二抗（04-15-06,KPL,1:1 000 稀释）室温孵育 1 h。用 ECL 超敏发光试剂盒进行显色，并在凝胶成像仪（ImageQuant RT ECL,GE）上照相。用 ImageJ 软件对图像进行灰度值分析，并计算目的蛋白表达量，计算公式如下：

目的蛋白表达量=目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

1.4 试验数据处理与分析

试验数据经采用 SAS 9.0 统计软件中的方差分析（ANOVA）程序进行显著性分析，$P<0.05$ 表示差异显著，$0.05\leq P<0.10$ 表示差异趋于显著。

2　结　果

2.1　细胞形态、相对增殖率、抗氧化功能及炎症因子含量

如表 1 及图 1 所示，与 CON 组相比，LPS 组的细胞形态发生了改变，细胞界限不清，细胞形态明显固缩，相对增殖率显著下降（P<0.05），较 CON 组降低 23.57%；抗氧化指标 T-SOD、CAT、GPx、TrxR 活性，T-AOC，SelP 含量均显著降低（P<0.05），而 ROS 和 iNOS 活性，NO、MDA 及炎症因子 TNF-α、IL-1 和 IL-6 含量呈相反变化规律，显著升高（P<0.05）。

与 LPS 组相比，Se 保护组中的 LSe20、LSe50、LSe100 和 LSe150 组的细胞形态固缩情况有所缓解，相对增殖率显著升高（*P*<0.05），LSe50 组为 Se 保护组中最高，且显著高于其他各试验组（*P*<0.05），LSe10、LSe200 组无显著变化（*P*>0.05）；LSe20、LSe50、LSe100 组的 T-AOC、CAT 和 TrxR 活性均显著高于 LPS 组（*P*<0.05），且 LSe50 组为 Se 保护组中最高，但 LSe10、LSe150、LSe200 组与 LPS 组无显著差异（*P*>0.05）。LSe50、LSe100、LSe150 组的 GPx 活性显著高于 LPS 组（*P*<0.05），以 LSe100 组为 Se 保护组中最高；但 LSe10、LSe20、LSe200 组与 LPS 组无显著差异（*P*>0.05）。所有的 Se 保护组 T-SOD 活性均高于 LPS 组，以 LSe50 组为 Se 保护组中最高。LSe50 组的 SelP 活性显著高于 LPS 组（*P*<0.05），其余各 Se 保护组均与 LPS 组差异不显著（*P*>0.05）。所有 Se 保护组的 MDA 含量及 ROS 活性均显著低于 LPS 组（*P*<0.05），且以 LSe50 组最低；NO 含量与 iNOS 活性也呈相似变化规律，但 NO 含量以 LSe100 组最低，iNOS 活性以 LSe50 组最低，LSe200 组的 NO 含量与 iNOS 活性均与 LPS 组无显著差异（*P*<0.05）。LSe50、LSe100 组 TNF-α 及 IL-1 含量及 LSe20、LSe50 组的 IL-6 含量均显著低于 LPS 组（*P*<0.05），其他 Se 保护组与 LPS 组均无显著差异（*P*>0.05）。

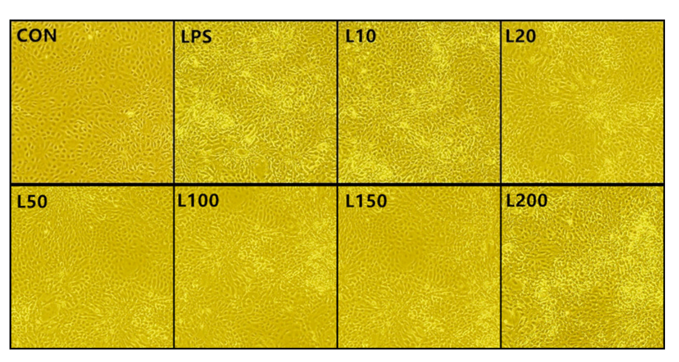


图 1　Se 对 LPS 诱导氧化损伤的 BMEC 形态的影响

Fig.1　Effects of Se on morphology of BMEC oxidative damaged by LPS （100×）

表 1　Se 对 LPS 诱导氧化损伤的 BMEC 相对增殖率、抗氧化功能及炎症因子含量的影响

Table 1　Effects of Se on RGR, antioxidant function and inflammatory cytokine contents in BMEC oxidative damaged by LPS

项目 Items	组别 Groups								SEM	*P* 值 *P*-value
	CON	LPS	LSe10	LSe20	LSe50	LSe100	LSe150	LSe200		
相对增殖率 RGR/%	100.00^{a}	76.43^{de}	81.03^{cd}	82.71^{c}	88.81^{b}	83.73^{c}	81.74^{c}	73.07^{e}	1.50	<0.000 1
总超氧化物歧化酶 T-SOD/（U/mL)	22.03^{a}	15.35^{f}	18.06^{de}	17.56^{e}	20.37^{b}	18.90^{cd}	18.04^{de}	19.48^{bc}	0.42	<0.000 1
总抗氧化能力	2.65^{ab}	1.07^{d}	1.89^{bcd}	2.01^{bc}	3.02^{a}	1.99^{bc}	1.73^{cd}	1.40^{cd}	0.26	<0.000 2

T-AOC/（U/mL)										
过氧化氢酶 CAT/（U/mL)	2.60^{a}	1.57^{c}	1.88^{bc}	2.13^{b}	2.31^{ab}	2.12^{b}	1.92^{bc}	1.88^{c}	0.14	0.000 3
谷胱甘肽过氧化物酶 GPx/(U/mg prot)	44.49^{a}	19.74^{e}	23.07^{de}	25.78^{cde}	30.43^{bc}	36.78^{b}	28.43^{cd}	21.47^{de}	1.98	<0.000 1
硫氧还蛋白还原酶 TrxR/(pg/mL)	58.17^{a}	24.76^{d}	33.17^{cd}	40.91^{bc}	49.44^{ab}	47.99^{ab}	23.92^{d}	24.84^{d}	3.09	<0.000 1
硒蛋白 P SelP/(ng/mL)	10.50^{a}	8.82^{c}	9.31^{bc}	9.42^{bc}	9.96^{ab}	9.08^{c}	8.87^{c}	9.51^{bc}	0.22	0.000 1
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	3.06^{bcd}	4.30^{a}	3.51^{b}	3.37^{bc}	2.68^{d}	2.96^{cd}	3.23^{bc}	3.45^{bc}	0.16	<0.000 1
活性氧 ROS/(U/mL)	149.78^{bc}	182.43^{a}	157.57^{b}	157.43^{b}	135.37^{c}	160.07^{b}	157.13^{b}	166.25^{b}	4.93	<0.000 1
诱导型一氧化氮合酶 iNOS/(U/mL)	4.07^{d}	10.86^{a}	9.55^{ab}	7.63^{bc}	4.77^{d}	6.03^{cd}	8.30^{bc}	11.28^{a}	0.63	<0.000 1
一氧化氮 NO/（μmol/L）	188.17^{bc}	216.33^{a}	192.94^{bc}	184.50^{c}	181.58^{c}	177.19^{c}	192.94^{bc}	203.39^{ab}	4.97	0.000 8
肿瘤坏死因子-α TNF-α/(pg/mL)	181.16^{d}	222.63^{a}	212.04^{ab}	207.56^{ab}	189.75^{cd}	200.75^{bc}	215.38^{ab}	215.38^{ab}	4.88	<0.000 1
白介素-1 IL-1/(pg/mL)	113.61^{d}	146.87^{ab}	135.59^{bc}	134.67^{bc}	124.46^{cd}	125.11^{cd}	143.19^{ab}	149.05^{a}	3.95	<0.000 1
白介素-6 IL-6/(pg/mL)	296.13^{bc}	326.40^{a}	317.07^{ab}	288.13^{c}	294.13^{bc}	310.53^{abc}	310.27^{abc}	322.67^{a}	7.27	0.004 7

同行数据肩标相同或无字母表示差异不显著（$P>0.05$），不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。下表同。

Values in the same row with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same as below.

2.2　抗氧化酶和炎症因子的基因和蛋白表达量

如表 2 和图 2 所示，与 CON 组相比，LPS 组的 *GPx*1 和 *TrxR*1 基因和蛋白表达量均显著降低（$P<0.05$），而 *iNOS* 基因和蛋白表达量、炎症因子(*TNF-α*、*IL*-1 和 *IL*-6)及 MAPK 信号通路相关因子（*p38MAPK*、*JNK*、*ERK*1/2）基因表达量呈相反变化规律，均显著升高（$P<0.05$）。

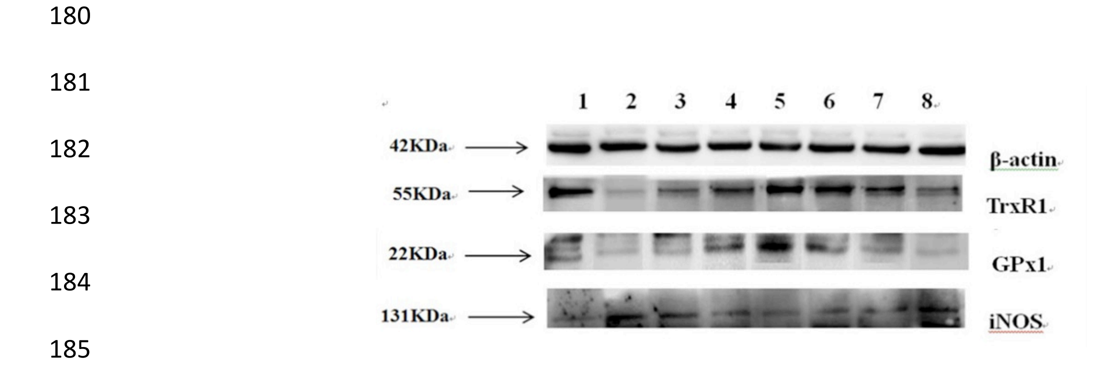
与 LPS 组相比，LSe20、LSe50、LSe100 组的 *GPx*1 和 *TrxR*1 基因表达量，LSe50、LSe100、LSe150、LSe200 组的 *SelP* 基因表达量均显著升高（$P<0.05$），LSe50 组的 *TrxR*1、*SelP* 基因表达量为 Se 保护组中最高。Se 保护组 GPx1 和 TrxR1 的蛋白表达量均显著高于 LPS 组（$P<0.05$），最高值也出现在 LSe50 组。与 LPS 组相比，LSe20、LSe50、LSe100 组的 *IL*-1 基因表达量及 *iNOS* 基因和蛋白表达量均显著降低（$P<0.05$），LSe50 组为 Se 保护组中最低，LSe200 组 *IL*-1 和 *iNOS* 基因表达量反而显著升高（$P<0.05$）。所有 Se 保护组的 *TNF-α* 基因

表达量均显著低于 LPS 组（P<0.05），LSe50 组 Se 保护组中最低。MAPK 信号通路相关的基因表达量与上述炎症因子呈现相似的变化趋势，与 LPS 组相比，*p38MAPK*（LSe20、LSe50、LSe100、LSe150 组）与 *ERK*1/2（LSe20、LSe50、LSe100 组）的基因表达量均显著降低（P<0.05），且以 LSe50 组为 Se 保护组中最低。所有 Se 保护组的 *JNK* 基因表达量均显著低于 LPS 组（P<0.05），以 LSe100 组为其组中最低。

表 2　Se 对 LPS 诱导氧化损伤的 BMEC 抗氧化酶和炎症因子基因及蛋白表达量的影响

Table 2　Effects of Se on expressions of genes and proteins of antioxidant enzymes and inflammatory cytokines in BMEC oxidative damaged by LPS

项目 Items	组别 Groups								SEM	P 值 P-value
	CON	LPS	LSe10	LSe20	LSe50	LSe100	LSe150	LSe200		
基因表达量 Gene expressions										
谷胱甘肽过氧化物酶 1 *GPx*1	1.00^{ab}	0.30^{d}	0.51^{cd}	1.07^{a}	0.93^{ab}	0.84^{b}	0.54^{c}	0.47^{cd}	0.06	<0.000 1
谷胱甘肽过氧化物酶 4 *GPx*4	1.00	1.21	1.29	1.49	1.48	1.33	1.46	1.24	0.12	0.139 3
硫氧还蛋白还原酶 1 *TrxR*1	1.00^{a}	0.23^{f}	0.38^{cde}	0.40^{cd}	0.71^{b}	0.47^{c}	0.34^{def}	0.27^{ef}	0.03	<0.000 1
硒蛋白 P *SelP*	1.00^{de}	0.59^{e}	0.93^{de}	1.37^{cde}	3.57^{a}	2.92^{ab}	2.57^{abc}	2.13^{bcd}	0.35	<0.000 1
白介素-1 *IL*-1	1.00^{f}	14.12^{b}	13.65^{b}	10.09^{cd}	6.57^{e}	7.78^{de}	12.69^{bc}	17.31^{a}	0.90	<0.000 1
白介素-6 *IL*-6	1.00^{c}	2.15^{a}	2.04^{a}	2.08^{a}	1.16^{bc}	1.96^{ab}	2.22^{a}	2.43^{a}	0.25	0.005 9
肿瘤坏死因子-α *TNF-α*	1.00^{e}	19.16^{a}	13.18^{bc}	11.06^{c}	7.33^{d}	12.34^{bc}	13.03^{bc}	15.06^{b}	0.78	<0.000 1
诱导型一氧化氮合酶 *iNOS*	1.00^{f}	2.33^{b}	2.02^{bc}	1.71^{cd}	1.20^{ef}	1.49^{de}	2.06^{bc}	2.94^{a}	0.12	<0.000 1
p38 丝裂原活化蛋白激酶 *p38MAPK*	1.00^{a}	1.89^{b}	1.49^{ab}	1.35^{a}	1.08^{a}	1.23^{a}	1.21^{a}	1.49^{ab}	0.15	0.014 6
c-Jun 氨基端激酶 *JNK*	1.00^{d}	3.57^{a}	2.14^{b}	1.84^{bc}	1.48^{bcd}	1.05^{d}	1.21^{cd}	1.83^{bc}	0.23	<0.000 1
细胞外信号调节激酶 1/2 *ERK*1/2	1.00^{d}	2.34^{a}	1.76^{abc}	1.35^{cd}	1.19^{cd}	1.56^{bcd}	2.10^{ab}	2.32^{a}	0.18	0.000 2
蛋白表达量 Protein expressions										
硫氧还蛋白还原酶 1 TrxR1	0.904^{c}	0.444^{f}	0.750^{d}	0.901^{c}	1.031^{a}	0.954^{b}	0.912^{c}	0.718^{e}	0.008	<0.000 1
谷胱甘肽过氧化物酶 1 GPx1	0.618^{b}	0.356^{d}	0.439^{c}	0.622^{b}	0.907^{a}	0.622^{b}	0.593^{b}	0.407^{c}	0.013	<0.000 1
诱导型一氧化氮合酶 iNOS	0.787^{cd}	0.936^{a}	0.928^{a}	0.810^{c}	0.682^{e}	0.768^{d}	0.848^{b}	0.928^{a}	0.008	<0.000 1



1：CON 组 CON group；2：LPS 组 LPS group；3：LSe10 组 LSe10 group；4：LSe20 组 LSe20 group；

5：LSe50 组 LSe50 group；6；LSe100 组 LSe100 group；7：LSe150 组 LSe150 group；8：LSe200 组 LSe200 group。

图 2 Se 对 LPS 诱导氧化损伤的 BMEC 抗氧化酶蛋白表达量的影响

Fig.2 Effects of of Se on expressions of proteins of antioxidant enzymes in BMEC damaged by LPS

3 讨 论

3.1 LPS 诱导 BMEC 引起的氧化损伤

细胞相对增殖率、抗氧化酶活性及炎症因子含量是反映细胞氧化应激状态的主要指标。正常情况下，体内的抗氧化酶会清除多余的自由基，使其维持在生理水平，参与机体的信号转导[14]。但当细胞遭受 LPS 等外源性刺激时，会产生大量的自由基并集聚[15]；自由基的过量产生会直接损伤 DNA、蛋白质和细胞器，促进细胞凋亡，启动炎症介质产生[16]。本试验用 LPS 诱导细胞后，与 CON 组相比，LPS 组的相对增殖率降低了 23.57%，T-SOD、GPx、TrxR、CAT 等抗氧化酶活性显著下降，而炎症因子 TNF-α、IL-1 和 IL-6 的含量及其基因表达量，MDA 含量，自由基 ROS 活性，NO 含量，iNOS 活性及其基因和蛋白的表达量显著升高，说明 LPS 诱导 BMEC 发生了氧化损伤。研究报道，LPS 经 Toll 样受体 4 受体蛋白识别将信号传入胞浆，引起 MAPK 信号通路的激活，而 p38 通路活化可使细胞内 *iNOS* 基因的表达量增加，产生大量 NO，过高含量的 NO 导致活性氮的产生、细胞信号通路的阻断及全身性不可控制的炎症发生，从而造成机体组织损伤[17]。MAPK 信号通路的激活能诱导 NF-κB 通路活化，活化的 NF-κB 促使炎症因子的大量生产，进而引起 NO 的大量释放，NO 的过量释放反过来又诱导 ERK1/2、p38MAPK 和 JNK 活化并刺激 NF-κB 的进一步活化，形成恶性循环，最终导致炎症反应，造成机体损伤[18-19]。可见，LPS 对细胞诱导的氧化损伤是通过 MAPK 信号通路的激活引起炎症因子的产生，进而诱导 *iNOS* 基因的过度表达和 NO 的过量产生。本研究发现，LPS 组的细胞炎症因子含量及其相关基因和蛋白表达量增加的同时，MAPK 信号通路被激活，相关因子 *p38MAPK*、*JNK 及 ERK*1/2 的基因表达量显著升高，进一步验证了 LPS 对 BMEC 诱导的氧化损伤与其 NO 的过量产生有关。

3.2 Se 对 LPS 诱导的氧化损伤的保护作用及其机制

本研究结果显示，与 LPS 组相比，Se 保护组降低了 TrxR、GPx 等抗氧化酶活性，*TrxR*1、*GPx*1 基因和蛋白的表达量，降低了 MDA 含量、ROS 活性、NO 含量、iNOS 的基因和蛋白

表达量，并下调了炎症因子的含量及基因表达量，说明 Se 可以提高细胞的抗氧化功能，对 LPS 诱导引起的 BMEC 氧化损伤具有保护效果。Se 作为体内抗氧化酶如 TrxR、GPx 的组成成分，通过清除体内的自由基而发挥抗氧化性损伤的作用，可防止生物大分子发生氧化应激反应。因此 Se 对 BMEC 氧化损伤的保护机制与硒蛋白活性的增强有关。过量 NO 的产生是引起细胞产生损伤的主要原因之一。Zhao 等[20]的研究指出，Se 的缺乏引起雏鸡的胰腺组织中 *TrxR* 的基因表达量显著降低，*iNOS* 的基因表达量及 NO 含量显著升高。研究发现，促炎症因子 IL-1β 可诱导细胞内的 iNOS 活性升高和其基因及蛋白表达量增加，进而促进 NO 的大量合成，导致炎症加重[21]。小鼠巨噬细胞的相关研究结果指出，Se 是通过降低炎症因子的基因及蛋白表达量[22]，减少了炎症因子的释放，实现了其对细胞氧化应激的保护作用，提高了细胞的抗氧化及抑炎功能。本研究以 BMEC 为对象的研究得出了类似的结果，Se 保护组降低了炎症因子 TNF-α、IL-1 和 IL-6 含量及其基因表达量，结合抗氧化功能、自由基含量和细胞活性的变化结果说明，Se 对 BMEC 氧化损伤的保护作用与其降低了炎症因子的基因和蛋白表达量，引起 iNOS 的活性降低，进而减少了 NO 的大量生成有关。

在炎症反应中，细胞因子 *IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α* 基因表达量增加与信号通路 MAPK 信号转导的增强有关，Se 可能通过调节硒蛋白的表达抑制 MAPK 等信号途径参与细胞信号转导调控，下调炎症相关基因的表达并促进重建免疫稳态而使机体恢复健康[23]。MAPK 家族包括 p38MAPK、JNK 和 ERK，它们分别可被上游相应的激酶活化，其中 ASK-1 是 MAPK 家族的重要成员，是 MAPK 信号通路的上游激动剂，还原型 Trx 结合在 ASK-1 的 N 端区域，起抑制其活性的作用，当 Trx 由于 TrxR 活性降低转变为氧化形式时，ASK-1 被激活，从而激活 MAPK 信号通路中的 JNK 和 p38MAPK [10]。巨噬细胞体外培养研究表明，LPS 可诱导 MAPK 信号通路的活化，增加 ROS 和 NO 的产生，而加 Se 显著降低了 LPS 诱导的 H_2O_2 的生成以及 p38 的活化[21]，降低了 NO 等促炎因子的产生[24]。柳晨[24]利用转染 *Trx* 基因的小鼠神经嵴母瘤细胞建立了 NO 毒性模型，研究了 *Trx* 基因的表达与 NO 的关系，研究发现 Trx 可以保护小鼠神经嵴母瘤细胞免受 NO 诱导的损伤，其原因可能是 Trx 的 S-亚基能绑定 NO，减少 NO 含量，清除氧自由基，提高细胞抗氧化水平[25]。本课题组的前期研究指出，Se 的补加可显著增强奶牛血液中的 TrxR 活性，促进奶牛的抗氧化功能[3]。本研究结果得出，Se 保护组的 TrxR 活性及 *TrxR*1 基因和蛋白表达量上调，而 MAPK 信号通路相关因子的基因表

达量下调，提示 BMEC 受到 LPS 损伤后，Se 可能是通过上调硒蛋白 *TrxR*1 的基因和蛋白表达量，增加了 TrxR 活性，抑制了 MAPK 信号通路的活化，进而通过抑制 IL-1 的产生，降低 iNOS 活性，减少 NO 的释放，从而对 BMEC 氧化损伤起到保护作用。然而，本研究并未对 *TrxR*1 基因行沉默和过表达，需要进一步验证。

适宜水平的 Se 可以促进细胞增殖，增强抗氧化功能及免疫功能[11]；而高水平的 Se 则抑制细胞增殖，并且减弱机体抗氧化功能及免疫功能，甚至导致机体病理性损伤[26]。本研究也得出 Se 对 BMEC 氧化应激的保护作用与其水平有关，10 nmol/L 的 Se 对 BMEC 无显著保护作用，20~100 nmol/L 的 Se 保护作用较好，尤其 50 nmol/LSe 的保护效果最好。然而，随着 Se 水平进一步增加，保护作用逐渐减弱，尤其是 200 nmol/L 的 Se 不仅没有保护效果，反而引起细胞发生损伤。这可能是由于 Se 能代替含硫化合物中的硫原子，对多种酶和含硫氨基酸有抑制作用，同时抑制体内的抗氧化过程而产生毒害[27]。Se 的毒性也可能是正常金属元素和微量元素紊乱导致的结果。这种紊乱反过来又可能影响生物体内代谢途径和级联反应，并伴随着炎症反应的发生，最终导致氧化应激[28]。虽然 Se 对机体有保护作用，但其毒性范围较小，毒性剂量大概在营养需要的 3~5 倍[29]。因此，合理控制 Se 的添加水平是 Se 发挥抗氧化及抑炎作用的前提。

4 结　论

① Se 可提高 BMEC 的抗氧化功能，对 LPS 引起的细胞氧化损伤具有保护作用，其机制是 Se 增强 TrxR 活性从而抑制 MAPK 信号通路的激活，最终减少 NO 的大量释放，但过高水平的 Se 会对细胞造成损伤。

② 培养液中 20~100 nmol/L Se 的保护作用较好，尤其以 50 nmol/L Se 效果最好。

参考文献：

[1] 胡菡,王加启,李发弟,等.高温诱导体外培养奶牛乳腺上皮细胞的应激响应[J].农业生物技术学报,2011,19(2):287–293.

[2] 郭咏梅,张博綦,石惠宇,等.二乙烯三胺/一氧化氮聚合物诱导的奶牛乳腺上皮细胞损伤模型的建立[J].动物营养学报,2016,28(8):2378–2384.

[3] GONG J,NI L L,WANG D F,et al.Effect of dietary organic selenium on milk selenium concentration and antioxidant and immune status in midlactation dairy cows[J].Livestock

Science,2014,170:84–90.

[4] JUNIPER D T,PHIPPS R H,GIVENS D I,et al.Tolerance of ruminant animals to high dose in-feed administration of a selenium-enriched yeast[J].Journal of Animal Science,2008,86(1):197–204.

[5] MACMICKING J,XIE Q W,NATHAN C.Nitric oxide and macrophage function[J].Annual Review of Immunology,1997,15:323–350.

[6] SANG J R,JIANG M Y, LIN F,et al.Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants[J].Journal of Integrative Plant Biology,2008,50(2):231–243.

[7] CHENG A W M,STABLER T V,BOLOGNESI M,et al.Selenomethionine inhibits *IL*-1*β* inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) and cyclooxygenase 2 (*COX*2) expression in primary human chondrocytes[J].Osteoarthritis and Cartilage,2011,19(1):118–125.

[8] FERRET P J,SOUM E,NEGRE O,et al.Protective effect of thioredoxin upon NO-mediated cell injury in THP1 monocytic human cells[J].Biochemical Journal,2000,346(3):759–765.

[9] OBATA T,BROWN GE,YAFFE M B.MAP kinase pathways activated by stress:the p38 MAPK pathway[J].Critical Care Medicine,2000,28(4S):N67–N77.

[10] SOGA M,MATSUZAWA A,IOCHIJO H.Oxidative stress-induced diseases via the ASK1 signaling pathway[J].International Journal of Cell Biology,2012,2012:439587.

[11] 弓剑.硒对奶牛乳腺抗氧化功能的影响及其机理研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2014.

[12] 高瑞峰.绿原酸抗乳腺炎作用及机制研究[D].博士学位论文.长春:吉林大学,2014.

[13] SHI H Y,GUO Y M,LIU Y,et al.The *in vitro* effect of lipopolysaccharide on proliferation,inflammatory factors and antioxidant enzyme activity in bovine mammary epithelial cells[J].Animal Nutrition,2016,2(2):99–104.

[14] 梁馨予,张婷,周永,等.杨梅素减轻高糖诱导的血管内皮细胞氧化应激损伤[J].第三军医大学学报,2013,35(21):2301–2305.

[15] MO C F,WANG L,ZHANG J,et al.The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways

is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice[J].Antioxidants & Redox Signaling,2014,20(4):574–588.

[16] KUNZ A,DIRNAGL U,MERGENTHALER P.Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury[J].Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology,2010,24(4):495–509.

[17] BRUBAKER S W,BONHAM K S,ZANONI I,et al.Innate immune pattern recognition:a cell biological perspective[J].Annual Review of Immunolgy,2015,33(1):257–290.

[18] MARÍN M,GINER R M,RÍOS J L,et al.Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis[J].Journal of Ethnopharmacology,2013,150(3):925–934.

[19] DRABAREK B,DYMKOWSKA D,SZCZEPANOWSKA J,et al.TNF-α affects energy metabolism and stimulates biogenesis of mitochondria in EA.hy926 endothelial cells[J].The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,2012,44(9):1390–1397.

[20] ZHAO X,YAO H D,FAN R F,et al.Selenium deficiency influences nitric oxide and selenoproteins in pancreas of chickens[J].Biological Trace Element Research,2014,161(3):341–349.

[21] 黄建花,何英,赖国旗.川芎嗪对 IL-1β 诱导的兔原代软骨细胞 iNOS 表达和 NO 合成的影响[J].第三军医大学学报,2012,34(16):1642–1645.

[22] KIM S H,JOHNSON V J,SHIN T Y,et al.Selenium attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress responses through modulation of p38 MAPK and NF-κB signaling pathways[J].Experimental Biology and Medicine,2004,229(2):203–213.

[23] SALMAN S,KHOL-PARISINI A,SCHAFFT H,et al.The Role of dietary selenium in bovine mammary gland health and immune function[J].Animal Health Research Review,2009,10(1):21–34.

[24] 柳晨.基于 TRX 转基因细胞抗氧化应激损伤作用中对 NO 水平的调节作用研究[D].硕士学位论文.大连:大连医科大学,2013.

[25] MURATA M,AKAO M,O'ROURKE B,et al.Mitochondrial ATP-sensitive potassium

channels attenuate matrix Ca^{2+} overload during simulated ischemia and reperfusion:possible mechanism of cardioprotection[J].Circulation Research,2001,89(10):891–898.
[26] WANG Y C,JIANG L,LI Y F,et al.Effect of different selenium supplementation levels on oxidative stress,cytokines,and immunotoxicity in chicken thymus[J].Biological Trace Element Research,2016,172(2):488–495.
[27] 王丽鑫,胡晓蓉,谭智勇,等.生物体内汞与硒的相互作用[J].重庆环境科学,2012,24(2):73–75.
[28] HAUSER-DAVIS R A,SILVA J A N,ROCHA R C C,et al.Acute selenium selenite exposure effects on oxidative stress biomarkers and essential metals and trace-elements in the model organism zebrafish(*Danio rerio*)[J].Journal of Trace Elements in Medicine and Biology,2016,33:68–72.
[29] TUZEN M,PEKINER O Z.Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometric for selenium speciation in foods and beverages[J].Food Chemistry,2015,188:619–624.

Protective Effects of Selenium on Bovine Mammary Epithelial Cells Oxidative Damaged by Lipopolysaccharide

GUO Yongmei ZHANG Boqi YAN Sumei* SHI Binlin GUO Xiaoyu
(*College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot* 010018, *China*)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the protective effects of selenium (Se) on bovine mammary epithelial cells (BMECs) oxidative damaged by lipopolysaccharide (LPS) and the mechanism. The third-generation attachment cultured BMECs were randomly divided into 8 groups with 6 replicates per group and 1 culture pore per replicate. BMECs in control group were cultured in a basal medium without Se and LPS for 30 h. BMECs in LPS group and Se protection groups were exposed in Se with different concentrations (0, 10, 20, 50, 100, 150 and 200 nmol/L) for 24 h, and then treated with LPS (1 μg/mL) for 6 h. The results showed as follows: 1) compared with CON group, the relative proliferation rate in LPS group was significantly decreased (P<0.05),

*Corresponding author, professor, E-mail: yansmimau@163.com (责任编辑 王智航)

the activities of glutathione peroxidase (GPx), thioredoxin reductase (TrxR), superoxide dismutase (T-SOD) and catalase (CAT), and total antioxidant capacity (T-AOC) in LPS group were significantly decreased ($P<0.05$), and expressions of genes and proteins of *GPx*1 and *TrxR*1 and selenoprotein P (SelP) content in LPS group was significantly decreased ($P<0.05$); however, nitric oxide (NO) content, activity, gene and protein expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS), contents and gene expressions of inflammatory factors [tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6)], active oxygen (ROS) activity, and malondialdehyde (MDA) content in LPS group were significantly increased ($P<0.05$), and gene expressions of factors related to the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway [p38 mitogen-activated protein kinase (*p*38*MAPK*), c-Jun N terminal kinase (*JNK*) and extracellular signal-regulated kinas 1/2 (*ERK*1/2)] in LPS group showed the same tendency. 2）Compared with LPS group, with the increase of Se supplemental level in Se protection groups, relative proliferation rate, activities of T-SOD, CAT, GPx and TrxR, T-AOC, gene and protein expressions of *GPx*1 and *TrxR*1 were increased first and then decreased; while NO content, activity, gene and protein expressions of iNOS, contents and gene expressions of inflammatory factors [TNF-α, IL-1 and IL-6], gene expressions of factors related to MAPK signal pathway [*ERK*1/2, *JNK* and *p*38*MAPK*], ROS activity, and MDA content showed the opposite trend; Se at 20 to 100nmol/L showed better protection effects, and in general Se at 50nmol/L showed the best protection effects. The results indicate that Se improves the antioxidant function of BMECs, and protects cells from oxidative damage induced by LPS mainly by increasing TrxR activity, inhibiting the activation of MAPK signaling pathway, and then decreasing NO content, however, high level of Se can cause damage to cells. Se at 20 to 100 nmol/L in culture medium has a better protection effect, and Se at 50 nmol/L has the best effect.

Key words: selenomethionine; lipopolysaccharide; bovine mammary epithelial cell; oxidative damage; protective effect